

## $\alpha$ -油酰丙醇胺对人脐静脉内皮细胞黏附分子表达的影响

陈彩霞<sup>1</sup>, 金鑫<sup>2</sup>, 孟祥岚<sup>2</sup>, 张峰<sup>3</sup>, 张洪奎<sup>1</sup>

(厦门大学 1. 化学化工学院 化学系, 2. 医学院 药理学系, 3. 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:**目的 探讨  $\alpha$ -油酰丙醇胺对用肿瘤坏死因子 (TNF $\alpha$ ) 诱导的人脐静脉内皮细胞黏附分子 (VCAM-1, ICAM-1, E 选择素) 表达的影响。方法 从新鲜的脐带中分离出人脐静脉内皮细胞, 培养至 3~9 代, 用不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺 (10, 50, 100  $\mu$ mol/L) 孵育 12 h 后, 用 TNF $\alpha$  (20 ng/mL) 孵育 8 h, 采用荧光实时定量 PCR 和细胞酶联免疫吸附试验分别检测 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素的 mRNA 及蛋白的表达, 同时采用细胞黏附实验检测其对细胞黏附的影响。结果 相对于正常的人脐静脉内皮细胞, TNF $\alpha$  诱导后的人脐静脉内皮细胞黏附分子 (VCAM-1, ICAM-1, E 选择素) 的表达明显增加。 $\alpha$ -油酰丙醇胺可以显著的抑制 VCAM-1 的表达, 并呈现出一定的剂量依赖性, 而且对人急性单核细胞性白血病细胞 (THP-1) 的黏附也有明显的抑制作用, 但对 ICAM-1, E 选择素的表达却没有影响。结论  $\alpha$ -油酰丙醇胺和大多数的 PPAR 激动剂一样, 能够抑制慢性炎症, 减少单核细胞的黏附, 抑制 VCAM-1 的表达, 而对急性炎症没有作用, 如对 E 选择素的表达无影响。

**关键词:**  $\alpha$ -油酰丙醇胺; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 人脐静脉内皮细胞; 细胞黏附分子

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2009)02-0099-04

### The effect of $\alpha$ -Oleoylpropanolamide on the expression of cell adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells

CHEN Cai-xia<sup>1</sup>, JIN Xin<sup>2</sup>, MENG Xiang-lan<sup>2</sup>, ZHANG Feng<sup>3</sup>, ZHANG Hong-kui<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, 2. Department of Pharmacology, School of Medicine, 3. Department of Lifesciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** **Purpose** To investigate the effect of  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide on the expression of cell adhesion molecules such as VCAM-1, ICAM-1, E-selectin in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were pretreated with different concentrations of  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide for 12 h and then stimulated with TNF $\alpha$  for 8 h. Cell Enzyme linked immunosorbent assay. Real-time PCR and adhesion assay were performed to measure the expression of adhesion molecules in mRNA and protein levels and monocyte binding. **Results**  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide inhibited monocyte binding and the expression of VCAM-1, an adhesion molecule relatively specific for monocyte and lymphocyte adhesion and chronic inflammation. However it showed no effect on the expression of E-selectin nor ICAM-1. **Conclusion**  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide has the same effect as most of PPAR $\alpha$  activators on inhibiting the development of atherosclerosis.

**Key words:**  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide; peroxisome proliferator-activated receptor; human umbilical vein endothelial cells; cell adhesion molecules

过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs) 是一类由配体激活的核转录因子, 是核受体超家族成员之

一, PPAR $\gamma$  是 PPARs 中的一个亚型, 它是脂质、脂肪酸, 以及脂蛋白代谢的调节因子。过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR $\gamma$ ) 的配体可分为天然配体和合成配体, 天然配体主要来源于饮食和机体的代谢产物, 如长链不饱和脂肪酸, 包括油酸、亚油酸、花生四烯酸等。合成配体有贝特类降血脂药, 如 WY14643, 非诺贝特等等。

动脉粥样硬化是一类复杂的临床疾病, 其所致

收稿日期: 2008-10-29

基金项目: 厦门市科技计划高校创新项目 (3502Z20083007) 和厦门大学“活性有机小分子的合成化学与化学生物学”创新团队项目

作者简介: 陈彩霞 (1983-) 女, 福建莆田人, 硕士; 金鑫 (1962-) 男, 通信作者, 教授, 从事心血管药理学研究, Tel: 0592-2188676, E-mail: xinjin@xmu.edu.cn.

冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率逐年升高,形成机制目前尚未完全清楚。PPAR $\gamma$  在单核巨噬细胞,内皮细胞以及平滑肌细胞均有表达,显示了它的直接血管效应,可能有抗动脉粥样硬化作用<sup>[1-3]</sup>。大量实验表明,PPAR $\gamma$  可以通过直接作用于动脉管壁,抑制单核细胞向血管内皮聚集并转化为巨噬细胞,抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移,抑制泡沫细胞的形成等<sup>[4-5]</sup>。因此 PPAR $\gamma$  是目前动脉粥样硬化治疗研究中的热点之一。

油酰乙醇胺(OEA)是一种天然的脂肪酸乙醇胺,属于脂肪酸乙醇胺家族(FEA),已有实验表明,OEA是 PPAR $\gamma$  的一个具有高亲和性的天然配体<sup>[6-7]</sup>,在抗动脉粥样硬化方面具有显著的效果<sup>[8]</sup>,且在激活 PPAR $\gamma$  时存在结构选择性。本研究合成一种油酰乙醇胺类似物: $\omega$ -油酰丙醇胺( $\omega$ -Oleyl-propanolamide),观察该化合物是否也对动脉粥样硬化有影响,以期探索其构效关系,为寻求具有生物活性和药物活性的新的药物先导物质奠定基础。

## 1 材料

$\omega$ -油酰丙醇胺,自制;胎牛血清,新西兰 Hyclone 公司;低糖 DMEM 培养基、1640 培养基,日本 GIBCO 公司;bFGF、TNF $\alpha$ ,美国 Peprotech 公司;反转录试剂盒, Fermentas 公司;SYBR Green PCR 混合液,美国 Applied Biosystems 公司;鼠抗人 VCAM-1 单克隆抗体、Trizol,美国 Invitrogen 公司;鼠抗人 E-选择素单克隆抗体,德国 Bender 公司;鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体,美国 Chemicon 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗,美国 Mulsicences 公司;MK886、TMB、BCECF,美国 Sigma 公司;人急性单核细胞性白血病细胞(THP-1),苏州大学医学生物技术研究所以赠送。

核酸蛋白测定仪,美国 BECKMAN COULTER 公司;荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司。

## 2 方法

### 2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的分离和培养

取新鲜的正常剖腹产胎儿脐带 30 cm,无菌条件下用 0.05%胰蛋白酶和 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化静脉内皮细胞,分离出来的 HUVECs 置于细胞培养液中接种在铺有 0.1%凝胶的细胞板上,细胞培养液为含有 10%胎牛血清、100 u/L 青霉素、100 u/L 链霉素、5 ng/mL bFGF 的低糖 DMEM 培养液<sup>[9]</sup>。实验采用 3~9 代细胞。

### 2.2 细胞黏附实验

将 HUVECs 接种到 96 孔板,用不同浓度的  $\omega$ -油

酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)孵育 12 h,然后再用 TNF $\alpha$  (20 ng/mL)孵育 8 h。THP-1 用 BCECF 标记后加到 96 孔板中在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min,没有被黏附上的 THP-1 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗掉。然后细胞用 1%SDS 固定后,用多功能酶标仪检测其荧光强度(激发波长为 488 nm,发射波长为 535 nm)。

### 2.3 荧光实时定量 PCR 实验

将 HUVECs 用不同浓度的  $\omega$ -油酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)孵育 12 h 后,再用 TNF $\alpha$  (20 ng/mL)孵育 8 h,用冷的 PBS 洗两遍,用 Trizol 提取细胞总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定总 RNA 的浓度。按照反转录试剂盒说明取总 RNA 1  $\mu$ g 进行总体积为 20  $\mu$ L 的反转录,用 SYBR Green 染料进行实时定量 PCR,其中反应体系 20  $\mu$ L 中含有 SYBR Green 混合液(2  $\times$ )10  $\mu$ L,反转录产物 0.5  $\mu$ L,上下游引物 250 nmol。反应条件为:50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min 进行预变性,然后两步法进行扩增,95 $^{\circ}$ C 15 s 60 s,40 个循环。结果以 GAPDH 作为内参,以 TNF $\alpha$  组(不加药,仅加 TNF $\alpha$ )作为外参,采用公式  $2^{-CT}$  计算出样品相对于 TNF $\alpha$  组的浓度。引物序列为,VCAM-1 上游:5' GGG ACC ACA TCT ACG CTG ACA A 3',下游:5' GGC CAC TCA AAT GAA TCT CTG GA 3';ICAM-1 上游:5' CCT GAT GGG CAG TCA ACA GCT A 3',下游:5' ACA GCT GGC TCC CGT TTCA 3';E-选择素上游:5' CCT AGC AAG GCA TGA TGT TAA CCAG 3',下游:5' AAA CGT TTG GCC TCA TGG AAG 3';GAPDH 上游:5' GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC 3';下游 5' TGG TGA AGA CCC CAG TGGA 3'。

### 2.4 细胞酶联免疫吸附试验

为了检测细胞黏附分子蛋白水平的表达,采用细胞酶联免疫吸附试验对它进行检测。首先,在 96 孔板中每孔接种  $4 \times 10^5$  个细胞。用不同浓度的  $\omega$ -油酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)孵育 12 h 后,再用 TNF $\alpha$  (20 ng/mL)诱导 8 h 后用冷的 PBS 洗两遍,加入 4%多聚甲醛 100  $\mu$ L 在 4 $^{\circ}$ C 条件下固定 20 min,随后加入 2%牛血清白蛋白(BSA)100  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,每个孔分别加入已用 1%BSA 稀释好的鼠抗人 VCAM-1 单克隆抗体(1:200)、鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体(1:200)、鼠抗人 E-选择素单克隆抗体(1:150)各 50  $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗 5 遍,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(1:1500)80  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 PBS 洗 5 遍后加入底物(TMB 10  $\mu$ L + 底物缓冲液 90  $\mu$ L + 30% $H_2O_2$  0.2  $\mu$ L)100  $\mu$ L 室温下反应 15 min 后加入 2 mol/L  $H_2SO_4$  溶液 100  $\mu$ L 终止

反应。多功能酶标仪上测定其吸光度(A)值,测定波长为 450 nm,校正波长为 630 nm。

2.5 数据处理

各实验数据为实验重复 3 次的平均值,以( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 统计软件,以 One-way ANOVA 分析各组别之间的差异,各组间的比较采用 q 检验。

3 结果

3.1  $\alpha$ -油酰丙醇胺对细胞黏附的影响

结果见表 1。和正常的 HUVECs 相比,用 TNF $\alpha$  诱导的细胞黏附 THP-1 明显增加,增加了 2.7 倍,而用不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)孵育 12 h 后,可以抑制 THP-1 细胞的黏附,相对于正常的 HUVECs,增加的倍数分别降低为:0.4,0.9,1.2 倍。这种抑制效果呈现出一定的剂量依赖性。

表 1 不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺对细胞粘附的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1  $\alpha$ -Oleoylpropanolamide inhibites adhesion of THP-1 monocytoid cells to HUVECs( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度 / ( $\mu$ mol/L)	OD 值
正常对照组	-	23.33 $\pm$ 7.392 <sup>1</sup>
TNF $\alpha$ 诱导组 20 ng/mL	-	85.14 $\pm$ 11.66
TNF $\alpha$ + $\alpha$ -油酰丙醇胺低浓度组	10	51.95 $\pm$ 14.20 <sup>1</sup>
TNF $\alpha$ + $\alpha$ -油酰丙醇胺中浓度组	50	45.34 $\pm$ 10.31 <sup>1</sup>
TNF $\alpha$ + $\alpha$ -油酰丙醇胺高浓度组	100	31.69 $\pm$ 12.09 <sup>1</sup>

与 TNF $\alpha$  诱导组:<sup>1</sup>  $P < 0.05$

<sup>1</sup>  $P < 0.05$  vs TNF $\alpha$  group

表 2 不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺对 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素 mRNA 表达的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Real-time PCR for evaluation of mRNA expression of VCAM-1, ICAM-1 and E selectin( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度 / ( $\mu$ mol/L)	mRNA 的表达量/ %		
		VCAM-1	ICAM-1	E 选择素
正常对照组	-	0.346 $\pm$ 0.047 <sup>2</sup>	3.165 $\pm$ 0.157 <sup>2</sup>	0.67 $\pm$ 0.03 <sup>2</sup>
TNF $\alpha$ 诱导组	-	100	100	100
TNF $\alpha$ + 药物低浓度组	10	78.78 $\pm$ 4.926	92.74 $\pm$ 10.56	107 $\pm$ 11.48
TNF $\alpha$ + 药物中浓度组	50	21.68 $\pm$ 0.470 <sup>1</sup>	57.22 $\pm$ 10.371 <sup>1</sup>	93.61 $\pm$ 6.117
TNF $\alpha$ + 药物高浓度组	100	7.306 $\pm$ 0.677 <sup>2</sup>	54.74 $\pm$ 22.39 <sup>1</sup>	93.99 $\pm$ 17.29

与 TNF $\alpha$  诱导组:<sup>1</sup>  $P < 0.05, ^2 P < 0.01$

<sup>1</sup>  $P < 0.05, ^2 P < 0.01$  vs TNF $\alpha$  group

表 3 不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺对 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素蛋白表达的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Cell ELISA for detection of cell surface expression of VCAM-1, ICAM-1, and E selectin( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度 / ( $\mu$ mol/L)	A 值		
		VCAM-1	ICAM-1	E 选择素
正常对照组	-	0.051 $\pm$ 0.002 <sup>2</sup>	0.318 $\pm$ 0.015 <sup>1</sup>	0.041 $\pm$ 0.009 <sup>2</sup>
TNF $\alpha$ 诱导组	-	0.195 $\pm$ 0.024	0.724 $\pm$ 0.046	1.071 $\pm$ 0.144
TNF $\alpha$ + 药物低浓度组	10	0.182 $\pm$ 0.014	0.727 $\pm$ 0.072	1.085 $\pm$ 0.088
TNF $\alpha$ + 药物中浓度组	50	0.123 $\pm$ 0.004 <sup>2</sup>	0.674 $\pm$ 0.026	1.023 $\pm$ 0.031
TNF $\alpha$ + 药物高浓度组	100	0.108 $\pm$ 0.018 <sup>2</sup>	0.678 $\pm$ 0.049	1.027 $\pm$ 0.213

与 TNF $\alpha$  诱导组:<sup>1</sup>  $P < 0.05, ^2 P < 0.01$

<sup>1</sup>  $P < 0.05, ^2 P < 0.01$  vs TNF $\alpha$  group

3.2  $\alpha$ -油酰丙醇胺对 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素 mRNA 表达的影响

荧光实时定量 PCR 结果见表 2。和正常的 HUVECs 相比,用 TNF $\alpha$  诱导的细胞,VCAM-1, ICAM-1, E 选择素 mRNA 表达显著增加,用不同浓度的  $\alpha$ -油酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)孵育 12 h 后,对 VCAM-1 的表达有明显的抑制作用( $P < 0.01$ ),并呈剂量依赖性,相对于 TNF $\alpha$  组的抑制率分别为(21.3  $\pm$ 4.0)%, (78.6  $\pm$ 0.6)%, (93.0  $\pm$ 0.6)%,同时  $\alpha$ -油酰丙醇胺对 ICAM-1 也有抑制作用( $P < 0.05$ )但和对 VCAM-1 的作用相比,抑制效果比较弱,而对 E 选择素的表达并无影响( $P > 0.05$ )。

3.3  $\alpha$ -油酰丙醇胺对 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素蛋白表达的影响

细胞酶联免疫吸附试验结果见表 3。和荧光实时定量 PCR 的结果相似,在 TNF $\alpha$  诱导下,内皮细胞中 VCAM-1, ICAM-1, E 选择素蛋白的表达均明显升高, $\alpha$ -油酰丙醇胺(10,50,100  $\mu$ mol/L)对 VCAM-1 蛋白的表达有显著的抑制作用( $P < 0.01$ ),抑制率分别为(9.2  $\pm$ 7.6)%, (49.3  $\pm$ 3.2)%, (60.4  $\pm$ 10.3)%,也呈现一定的剂量依赖性,但对 ICAM-1, 和 E 选择素的蛋白表达却没有影响( $P > 0.05$ )。

4 讨论

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生的关键步骤,血管内皮损伤后可产生黏附分子如 VCAM-1、

ICAM-1、E-选择素等,这些黏附分子可促使单核细胞、T细胞黏附于内皮细胞上,在动脉粥样硬化早期斑块形成过程中起到了重要作用。研究表明,PPAR 与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,它在巨噬细胞、泡沫细胞中表达能减少炎症因子的产生,在血管内皮有抗炎作用。

多数合成的 PPAR 激活物可抑制慢性炎症,如单核细胞的聚集,VCAM-1 的表达,而对急性炎症没有作用。PPAR 激活物贝特类在动脉粥样硬化中,可以减少单核细胞的迁移,抑制 VCAM-1 的表达,从而抑制了单核细胞黏附到内皮细胞上,而不是抑制急性炎症反应<sup>[10-12]</sup>,如:E-选择素的表达。

为了研究 PPAR- 的构效关系,合成高效 PPAR-

受体激动剂,我们对 OEA 进行结构改造,合成了  $\omega$ -油酰丙醇胺,本实验是检验其在抗动脉粥样硬化方面的效果。本研究采取荧光实时定量 PCR 和细胞酶联免疫吸附试验以及细胞黏附试验进行检测。结果表明, $\omega$ -油酰丙醇胺可以对 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 分泌的 VCAM-1 表达有显著抑制作用,但对 ICAM-1、E-选择素的表达却没有影响。这与已有报道的大多数 PPAR 激活物在动脉粥样硬化形成过程中的作用一致,均可抑制慢性炎症,减少单核细胞的迁移,抑制 VCAM-1 的表达,而对急性炎症没有作用。本研究结果揭示了  $\omega$ -油酰丙醇胺与 OEA 相同,通过抑制 VCAM 的表达,减少单核细胞的黏附。

#### 参考文献:

- [1] Zandbergen F,Plutzky J. PPAR in atherosclerosis and inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*,2007,177:972-982.
- [2] Bouhlel M A,Staels B,Chinetti-Obaguidi G. Peroxisome proliferator-activated receptors from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease[J]. *J Intern Med*,2008,263:28-42.
- [3] Marx N,Galina K S,Collins T,et al. PPAR activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells[J]. *Circulation*,1999,99:3125-3131.
- [4] Zapolska-Downal D,Siennicka A,Kaczmarczyk M,et al. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells:the role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\alpha$ [J]. *Nutr Biochem*,2004,15:220-228.
- [5] Wang Yan,Wang Yan,Yang Qi,et al. Effects of bezafibrate on the expression of endothelial nitric oxide synthase gene and its mechanisms in cultured bovine endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*,2006,187:265-273.
- [6] Guzman M,Lo Verme J,Fu J,et al. Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ) [J]. *J Biol Chem*,2004,279:27849-27854.
- [7] Fu J, Gaetani S,Oveisi F,et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  [J]. *Nature*,2003,425:90-93.
- [8] 秦文,金鑫,陈彩霞,等. 油酰乙醇胺对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. *中国生化药物杂志*,2008,29(6):374-377.
- [9] Hagiwara H,Mitsumata M,Yamane T,et al. Laminar shear stress-induced GRO mRNA and protein expression in endothelial cells[J]. *Circulation*,1998,98:2584-2590.
- [10] Abe Y,Sugisaki K,Dannenberg A M. Rabbit vascular endothelial adhesion molecules:ELAM-1 is most elevated in acute inflammation,whereas VCAM-1 and ICAM-1 predominate in chronic inflammation [J]. *Leukoc Biol*,1996,60:692-703.
- [11] Jackson S M,Parhami F,Xi Xiaoping,et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,1999,19:2094-2104.
- [12] Cybulsky M I,Iiyama K,Li Hongmei,et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1,in early atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*,2001,107:1255-1262.

(上接第 98 页)

- [7] Costanza M Alessandra F,Alejandro H,et al. Purification of apolyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers[J]. *Phytochemistry*,2003,63(7):745-752.
- [8] 徐鹏,付绍平,王伟,等. 马铃薯酪氨酸酶体外筛选美白剂测定体系的建立[J]. *日用化学工业*,2007,37(6):385-388.
- [9] Maeda K,Fukuda M. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes[J]. *J Soc Cosmet Chem*,1991,42:361-368.
- [10] 高秀蕊,宋秀芹,陈会兰. 抗坏血酸对酪氨酸酶的抑制效应[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*,1990,14(1):36-40.
- [11] 高秀蕊,石双群,宋秀芹,等. 谷胱甘肽、甘露醇对酪氨酸酶的抑制和对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基的清除作用[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*,1990,14(2):4-8.
- [12] 曾伟成,郑能武,陈曾曼. 维生素 C 对酪氨酸酶催化反应的影响[J]. *中国生化药物杂志*,2001,22(6):300-302.